HVJ Envelope Cell Fusion Kit

GenomONE®-CF

取扱説明書

ISK 石原産業株式会社

＜使用上の注意＞

1. 本製品は、研究目的にのみご使用ください。ヒト・動物への医療・臨床目的および生体内外診断の目的には使用できません。
2. 本製品は、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」（カルタヘナ議定書担保法）の規制を受けずにご使用いただけますが、細胞融合の結果、当該法律の規制対象となる遺伝子組換え生物等が得られる可能性がある場合は、適切な拡散防止措置を執った上で実験を行なってください。
3. 本キットに含まれるHVJ-Eは感染性・増殖性はありませんが、膜融合活性を保持していますので、万一の人体への吸入や付着を防ぐため安全キャビネット内で操作し、実験者は手袋、マスク等の防護具をご使用ください。
4. 実験後の試験材料、容器等は必ずオートクレーブして適切に廃棄してください。
5. 本製品の使用によって生じた如何なる事故・損害に対しても、弊社では責任を負いかねますので、予めご了承ください。
6. 本製品の商業目的でのご使用、製品の改変等による再販売はできません。

１．製品仕様（冷蔵(4-8℃)保存）

GenomONE-CF 製品コード	凍結乾燥HVJ-E [1)] 0.26mL相当/本	HVJ-E懸濁用緩衝液 0.5mL/本	細胞融合用緩衝液 (20倍濃度) [2)] 10mL/本
CF001	1本	1本	1本
CF004	4本	3本	4本

[1)]HVJ-E: HVJ Envelope
加湿により活性が低下しますので、アルミ袋に密封して冷蔵保存してください。
[2)]使用時、無菌の純水（endotoxin-free注射用水等）で20倍希釈してご使用ください。

２．使用回数

■同種・異種間の細胞融合：凍結乾燥HVJ-E 1本あたり 約100回分
■B cell hybridoma作製：凍結乾燥HVJ-E 1本あたり 約10回分

３．保存安定性

■キットの品質保証期限：HVJ-Eの内袋に記載
■HVJ-E懸濁用緩衝液を用いて調製後のHVJ-E懸濁液： 冷蔵で2週間、分注後-80℃で3ヶ月間（凍結融解は1回のみ可能です）

４．品質

■HVJ-Eは、センダイウイルスのゲノムRNAを完全に不活化した精製品で、ヒトおよび動物への感染性・増殖性はありません。
■通常の実験室で安全に使用できます。
■HVJ-Eは、無菌試験で細菌・カビ類の混入がないことを確認しています。

５．操作手順

５－１：試薬類の準備

①HVJ-E懸濁液の調製

凍結乾燥HVJ-Eに、氷冷したHVJ-E懸濁用緩衝液0.26mLを添加し、泡立たないよう穏やかにピペッティングして均一な懸濁液としてください。懸濁後は活性の低下を防ぐため直ちに氷冷してください。

②細胞融合用緩衝液の調製

無菌の純水(endotoxin-free注射用水等)を用いて細胞融合用緩衝液(20倍濃度)を20倍希釈して使用してください。希釈した緩衝液は冷蔵で保存できます。

裏面へ続く

５－２：細胞融合の手順

①Suspension法

浮遊状態の同種または異種の細胞を融合させる場合に使用します。

②Plating法

プレートに接着した細胞に浮遊状態の細胞を添加して融合させる場合に使用します。

③B cell hybridoma作製用プロトコル

モノクローナル抗体産生細胞を調製する場合に使用します。

① Suspension法

Step	操　　作（Step 1～3はon iceで操作してください）
1	氷冷した融合用緩衝液（1倍濃度液*）に懸濁した細胞Aと細胞B(各々2×10^5 cells/25μL)とを2mLのチューブ（丸底タイプが望ましい）に入れてピペッティングにより混合
2	氷冷したHVJ-E懸濁液2.5μL**を添加してタッピングにより混合
3	On ice　5分間静置　＜この間にHVJ-Eが細胞表面に吸着する＞***
4	37℃，15分間インキュベーション（5分毎にタッピングして混合）**** ＜この間に細胞融合が起こる＞
5	増殖用培地（1.5～2 mL）を添加・混合後、6-well plateに播種して培養

*　キット付属の「細胞融合用緩衝液（20倍濃度）」を純水で20倍希釈してからご使用ください。

**　添加するHVJ-E量は、融合効率、細胞毒性の程度に応じて0.5～10μLの範囲で調整してください。

***　Step 3の後に遠心（4℃、2000rpm、5分間）を加えることにより、融合効率が高まる場合があります。遠心した場合は、細胞を再懸濁せず、ペレット化した状態でStep 4のインキュベーションを行なってください。ただし、融合しやすい細胞においては、遠心により多核細胞が増える傾向にあります。

****　多核細胞の出現や細胞傷害が顕著な場合は、インキュベーション後に遠心してHVJ-Eを除去してください。

② Plating法

Step	操　　作（Step 1～6はon iceで操作してください）	
	細胞A（浮遊状態）	細胞B（6-well plateで接着培養）
1	細胞A を氷冷した融合用緩衝液（1倍濃度液*) に懸濁（ 2×10^5 cells/25μL）	
2	氷冷したHVJ-E懸濁液2.5μL**を添加してタッピングにより混合	
3	On ice　5分間静置 ＜この間にHVJ-Eが細胞Aの表面に吸着する＞	
4	遠心（4℃, 2000rpm, 5分間）後、上清を除去	
5	氷冷した融合用緩衝液（1倍濃度液*）1mLを加え、ピペッティングにより混合（on ice静置）	培養上清を除去し、氷冷した融合用緩衝液（1倍濃度液*）で洗浄
6	細胞BのCell sheet上にHVJ-Eを処理した細胞Aを全量添加し、穏やかに混合	
7	プレート遠心（4℃～室温, 1000rpm, 5分間）	
8	37℃，15分間インキュベーション　＜この間に細胞融合が起こる＞	
9	上清を除去し、増殖用培地（1.5～2 mL）を添加して培養	

*　キット付属の「細胞融合用緩衝液（20倍濃度）」を純水で20倍希釈してからご使用ください。

**　添加するHVJ-E量は、融合効率、細胞毒性の程度に応じて0.5～10μLの範囲で調整してください。
また、使用する緩衝液の量は、plateの培養面積に応じて比例計算で調整してください。

③ B cell hybridoma作製用プロトコル

Step	操　　作（Step 4～6はon iceで操作してください）
1	＜脾臓細胞の調製＞ 免疫マウスより脾臓を摘出し、溶血操作後、無血清RPMI培地に懸濁し細胞懸濁液（～1×10^8 cells/マウス）を調製 ＜Myeloma細胞の調製＞ ディッシュで培養した細胞（～1×10^7 cells）を回収し、無血清RPMI培地に懸濁
2	脾臓細胞とmyeloma細胞を10:1の比率（細胞数）で混合（50mLコニカルチューブ）
3	遠心（4℃, 1000rpm, 5分間）し、上清を除去
4	氷冷した融合用緩衝液（1倍濃度液*）を添加（脾臓細胞10^8cellsあたり1mL）し、ピペッティングにより均一な懸濁液とする
5	氷冷したHVJ-E懸濁液を添加（細胞懸濁液1mLあたり25μL）
6	On ice　5分間静置 ＜この間にHVJ-Eが細胞の表面に吸着する＞
7	遠心（4℃, 1000rpm, 5分間）＜この操作で細胞間の接触が高まる＞ 上清を除去せず、細胞がペレット化した状態（再懸濁も行わない）で次ステップに移行
8	37℃, 15分間インキュベーション（混合せずに静置）＜この間に細胞融合が起こる＞ 上清を除去せずに次ステップに移行
9	37℃に加温した増殖用培地**をピペットで静かに混和しながら添加し懸濁 （脾臓細胞10^8cellsあたり50mLを添加）
10	96-well plateに播種（100μL/well）、 常法に従い翌日からHAT培地に交換して培養

*　キット付属の「細胞融合用緩衝液（20倍濃度）」を純水で20倍希釈してからご使用ください。
**　低温の培地を用いると細胞融合の効率が低下する可能性がありますので、必ず加温した培地をご使用ください。

融合効率（ハイブリドーマ陽性率）が低い場合は、Step 2の脾臓細胞とmyeloma細胞の混合比を変動させる（10:1～1:1）か、Step 5のHVJ-Eの添加量を増減（0.5～2倍）して、融合条件の最適化を行なってください。

お問い合わせ先
石原産業株式会社
開発企画研究本部　生命技術開発部

TEL:06-6444-7182
FAX:06-6444-7183
E-MAIL:HVJ-E@iskweb.co.jp
URL:http://www.iskweb.co.jp/hvj-e